

PT/EP 00/06223

EP 00/6223
10/01/9048

REC'D 11 SEP 2000

WIPO

PCT

PA 217516

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

March 07, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 09/347,531

FILING DATE: July 06, 1999

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS



T. Lawrence

T. LAWRENCE
Certifying Officer

Please type a plus sign (+) inside this box > / + /

1251
72/60
07/06/99
USPTO

JCS35 U.S. PTO

UTILITY	Atty Doc. No. <u>50461</u> Total Pages <u>10</u>
PATENT APPLICATION	FIRST NAMED INVENTOR OR APPLICATION IDENTIFIER
TRANSMITTAL	Ernst HEINZ
Application Elements	Express Mail Label No. _____

Address To: Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, D.C. 20231

1. /X/ Fee transmittal Form
(Submit an original, and a duplicate for fee processing)
2. /X/ Specification Total Pages /
(Preferred arrangement set for below)

Descriptive title of the Invention

Cross References to Related Application

Statement Regarding Fed. Sponsored R & D

Reference to Microfiche Appendix

Background of the Invention

Brief Summary of the Invention

Brief Description of the Drawings (if filed)

Detailed Description

Claim(s)

Abstract of the Disclosure

3. /X/ Drawing(s)(35 USC 113) Total Sheets /3 /

4. / /Oath or Declaration Total Pages/ /

- a. / / Newly executed (original or copy)
b. / /Copy from a prior application (37 CFR 1.63(d))
(For Continuation/Divisional with Box 17 completed)

i. / DELETION OF INVENTOR(S)

Signed statement attached deleting
inventor(s) named in the prior application
see 37 CFR 1.63(d)(2) and 1.33(b).

5. / / Incorporation by reference (useable if Box 4b is checked)
The entire disclosure of the prior application, from which a
copy of the oath or declaration is supplied under Box 4b
is considered as being part of the disclosure of the accompanying
application and is hereby incorporated by reference therein.

17. If a Continuing Application, check appropriate box and supply the requisite information:

/ /Continuation / /Divisional / /Continuation-in part (CIP) of prior application No. _____

CORRESPONDENCE ADDRESS

/ / Customer Number or Bar code Label

or / / Correspondence address below

Insert Customer No. or Attach bar code label here

Name: Herbert B. Keil
KEIL & WEINKAUF

Address: 1101 Connecticut Ave., N.W.

City Washington

State: D.C.

Zip Code 20036

Country USA

Telephone: (202)659-0100

Fax: (202)659-0105

The filing fee has been calculated as shown below:

For:	Number Filed	Number Extra	SMALL/LARGE ENTITY	BASIC FEE
				\$380./\$760.
Basic Fee.....				\$ 760.00
Total Claims: 5 -20 =		x \$09./\$18. =		
Indep. Claims : 1 -3 =		x \$39./\$78. =		
[] Multiple Dependent Claim(s) presented:	\$130./260	=		
[x] A check is enclosed for the filing fee.				\$ 760.00

*If the difference is less than zero, enter "0".

[X] A check for \$ 760. for the filing fee.

[X] The Commissioner is hereby authorized to charge any other fee required, including the issue fee, in connection with the filing and prosecution of this application, and to the extent necessary, applicant(s) hereby petition for extension(s) of time under 37 CFR 1.136, to be charged to our Deposit Account 11-0345.

Respectfully submitted,
KEIL & WEINKAUF

Herbert B. Keil
Herbert B. Keil
Reg. No. 18,967

1101 Connecticut Ave., N.W.
Washington, D.C. 20036
(202)659-0100

THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
HEINZ et al.) Art Unit:
Serial No. Not Assigned)
Examiner:
)
Filed: Filed with application

TITLE: CHARACTERIZATION OF A NEW DELTA-6 DESATURASE FROM
PHYSCOMITRELLA PATENS

PRELIMINARY AMENDMENT

Hon. Commissioner of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

Sir:

Prior to examination, kindly amend the above-identified application as follows:

IN THE CLAIMS

Claim 5, line 1, delete "or 4".

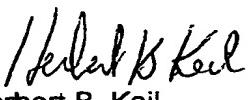
R E M A R K S

The claims have been amended to eliminate multiple dependency. No new matter has been added.

Entry of the above amendment is respectfully solicited.

Respectfully submitted,

KEIL & WEINKAUF


Herbert B. Keil

Reg. No. 18,967

1101 Connecticut Ave., N.W.
Washington, D.C. 20036
(202)659-0100

Characterization of a new Delta-6 Desaturase from *Physcomitrella patens*

5 Description

This invention describes the isolation and functional characterization of a novel enzyme, delta₆-desaturase, from the moss *Physcomitrella patens* that introduces a double bond after the sixth carbon atom from the carboxy terminus of fatty acids.

Long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA's) are important for human and animal nutrition. They are critical components of organelle membranes. Moreover, they have been involved in pathological conditions such as carcinogenesis and cardiovascular diseases. More importantly, they represent a unique class of precursors for conversion into metabolites that regulate critical biological functions. In higher animals, the PUFA-ecosanoid system regulates crucial developmental and physiological processes. Arachidonic acid (ARA) is the most abundant PUFA in the human body and the corresponding ecosanoid (prostaglandin) also predominates in the organism.

The moss *P. patens* produces large amounts of ARA (25% of the total fatty acids). The second step in the dedicated biosynthesis of ARA, the conversion of linoleic acid into gamma-linolenic acid, is catalyzed by a delta₆-desaturase. The same enzymatic activity is also required for the production, in other organisms, of other nutrition-important PUFA's: i.e. eicosapentanoic acid (EPA) and docosahexanoic acid (DHA).

There are to date 9 clones, including the one described in this invention, coding for delta₆-desaturase enzymes (*Physcomitrella patens* [1], *Caenorhabditis elegans* [2], *Spirulina platensis* [3], *Borago officinalis* [4], *Mortierella alpina* [5], *Homo sapiens* [6], *Rattus norvegicus* [7], *Maus musculus* [6], ; *Synechocystis* sp [8]). Only the described in this invention and the *C.elegans* enzyme originate from organisms that normally produce ARA.

The invention described here is especially suited for the production of precursors in the biosynthesis of ARA, as well as other PUFA's, in a transgenic system, especially in plants. This is justified by the likely possibility of substrate channeling between the further involved enzymes and the presented delta₆-desaturase. As mentioned above, the described enzyme originates from an organism that synthesizes large amounts of ARA. Moreover, the codon-usage of the *P. patens* enzyme should be more similar to plants as

2

that of *Caenorhabditis elegans*. This enzyme contains a 100-amino acid N-terminal extension with no sequence similarity to other proteins in the databases. This extension has to date no functional relevance.

5

Fig 1. shows the cDNA and the deduced amino acid sequence of the delta6-desaturase. Another aspect of this invention are delta6 desaturases with a polypeptide sequence produced by insertion, deletion or substitution or a combination thereof of up to 40%, 10 preferred up to 20% of all amino acids of Fig.1. The change in the amino acid sequence can be easily produced by known methods of genetic engineering e.g. site directed mutagenesis. The biological activity (delta6 desaturase) can be checked by known assays e.g. those disclosed in this invention.

15

Another aspect of the invention are polynucleotides coding for the polypeptides disclosed above.

Another aspect of the invention is a process for the production 20 of unsaturated fatty acids by incubation of saturated fatty acids with a polynucleotide disclosed above under conditions where this polypeptide has a delta6 desaturase activity.

Another aspect of the invention is a process for the production 25 of unsaturated fatty acids in plants by producing transgenic plants which have been transformed with a polynucleotide disclosed above, growing these transformed plants and isolating the unsaturated fatty acids from these plants.

30 These processes are preferred for the production of arachidonic acid.

Example 1:General Protocols

35 1. Plant material and culture conditions:

The protonemata of *P. patens* were grown in liquid medium as described in Reski et al (1994) [9].

40 2. Nucleic acid analyses

DNA manipulations were performed according to standard protocols [10] unless otherwise stated. Nucleotide sequences were determined following the chain-termination protocol with a cycle-sequencing 45 protocol following manufacturers suggestions (Perkin Elmer).

3. Lipid Analysis

Lipids were extracted from protonemata and yeast cells by chloroform-methanol extraction [11] and purified by TLC in diethyl ether. Fatty acids were transmethylated to produce methyl esters. These were analyzed by gas-liquid chromatography. Their identities were confirmed by comparison with appropriate standards. Corresponding fatty acid pyrrolidides were obtained as previously described [12] and analyzed by GLC-MS.

10

4. Transformation of *P. patens*

The PEG-mediated direct DNA transformation of protoplasts was performed as described by Schäfer et al (1991) [13]. Selection 15 on G418-containing media was performed as described in Girke et al (1998) [1].

Example 2: Isolation of the delta6-desaturase cDNA and genomic clones from *P. patens*

20

A PCR-based approach was followed using degenerated oligonucleotides as primers. Poly(A)+ RNA was isolated from a 12-day *P. patens* protonema culture. This poly(A)+ RNA was reverse transcribed using the following oligonucleotide as primer: GATCTAGACTC-25 GAGGTCGAC(T)14. The resulting ss-cDNA was used as template in a PCR with the following primers (A:

TGGTGGAA(A/G)TGGA(C/A)ICA(T/C)AA and B. GG(A/G)AA(A/C/G/T)A(A/G)(G/A)TG(G/A)TG(C/T)TC) and the following temperature program: 94°C, 3 min; [94°C, 20 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min] 30 30 cycles; 72°C 5 min.. Fragments of the expected length (i.e. 500-600 bp) were cloned into pUC18 and sequenced. The deduced amino acid sequence of a PCR fragment showed to known delta6-desaturases. As *P. patens* was expected to have delta6-desaturase activity, it was postulated that this clone originated from this 35 desaturase.

A full-length cDNA clone, PPDES6-cDNA, was isolated from a *P. patens* cDNA bank from 12-day-old protonemata using the PCR fragment as probe. The nucleotide and deduced amino acid sequences 40 of this clone are shown in Fig.1. The corresponding genomic sequence (PPDES6-gen) was isolated by PCR using cDNA-derived oligonucleotides (C: CCGAGTCGGATCAGCC and D: CAGTACATTGGTCATTCACC) as primers. The nucleotide sequence of this clone is shown in Fig. 2.

45

Table 1 presents the results of the deduced amino acid sequence comparisons, using the complete sequences, of the *P. patens* delta6-desaturase with that of the known delta6-desaturases. This analysis was performed using the Gap Program of the GCG Package (Version 9.1) with the following analysis parameters: scoring matrix, blosum62; gap creation penalty, 12; gap extension penalty, 4.

	Sequence	Amino acid sequence identity (similarity) (%)
10	<i>Borago officinalis</i>	31 [38]
	<i>Synechocystis sp</i>	21 [29]
	<i>Spirulina platensis</i>	20 [29]
15	<i>Caenorhabditis elegans</i>	35 [43]
	<i>Mortierella alpina</i>	39 [47]
	<i>Homo sapiens</i>	27 [38]
	<i>Rattus norvegicus</i>	28 [39]
20	<i>Maus musculus</i>	29 [39]

Table 1: Deduced amino acid sequence comparison of the *P. patens* delta6-desaturase with that of the delta6-desaturase of *Borago officinalis* (U79010), *Synechocystis sp* (L11421), *Spirulina platensis* (X87094), *Caenorhabditis elegans* (AF031477), *Mortierella alpina* (WO 98/46764), *Homo sapiens* [6], *Rattus norvegicus* (AB021980) and *Maus musculus* [6]. The results represent the identity or similarity (%) found for the different sequences in comparison to the *P. patens* sequence.

30

Example 3: Knock-out of Delta6-desaturase gene in *P. patens*

The biological function of the delta6-desaturase gene was shown upon its disruption in the genome of *P. patens*. This was achieved with the construct pGK as follows: a SauI/BstBI fragment of PPDES6-gen was replaced by a 35S promoter/nptII/35S terminator expression cassette. This expression cassette was constructed by cloning the nptII gene (HindIII-blunt, XbaI fragment) from PRT101neo [14] between the 35S CaMV promoter and 35S terminator 35 (digested with XbaI-blunt and XbaI) of pRT101 [15] (see Fig. 3). The resulting construct (pGK) was digested with AatII and HpaI, originating a fragment containing the selection marker flanked by genomic sequences of 923 bp and 1159 bp. This fragment, without separation of the vector, was used to transform *P. patens* protoplasts.

The fatty acid composition of the wild type as compared to that of five independent knock-out mutants was analyzed. The analyses presented in Fig. 4 show the results obtained with the wild type and with one of the mutants, K2. However, the other isolates gave essentially the same results. The quantification of these peaks is presented in Fig. 4 are shown in Table 2.

Fatty Acids		Cultures and Total Fatty Acids (%)		
		Wild type	K2	K2 + γ 18:3 ^{6,9,12}
10	16:0	22.3	19.6	21.9
	16:2 ^{7,10}	5.1	4.9	3.1
	16:3 ^{7,10,13}	1.7	5.6	3.1
	18:0	0.4	0.2	0.5
	18:1 ⁹	2.0	1.4	1.3
	18:2 ^{9,12}	23.3	32.6	20.3
15	g18:3 ^{6,9,12}	3.3	0.2	11.5
	a18:3 ^{9,12,15}	7.5	20.9	13.4
	18:4 ^{6,9,12,15}	0.2	< 0.1	0.2
	20:2 ^{11,14} (ω 6)	0.4	1.7	0.6
	20:3 ^{5,11,14} plus 20:3 ^{8,11,14}	1.9	2.6	4.1
20	(ω 6)*			
	20:3 ^{11,14,17} (ω 3)	2.1	0.9	0.2
	20:4 ^{5,8,11,14}	25.6	4.1	16.4
	20:4 ^{5,11,14,17}	0.1	0.7	0.1
	20:5 ^{5,8,11,14,17}	1.6	0.1	0.1
25				

Table 2: Fatty acid profile of wild type *Physcomitrella patens* and that of the knock-out K2 with and without addition of γ 18:3^{6,9,12}. Presented is the percentage of the area of the peaks shown in Fig. 4. The asterisk (*) denotes that the percentage of the fatty acids, 20:3^{5,11,14} and 20:3^{8,11,14}, is given as one.

The production of ARA is drastically reduced in the K2 isolate in comparison to the wild type. The residual amount of ARA is likely to originate from the expression of another enzyme with delta6-desaturase-like activity. This indication is strengthened by the results of Southern blot analyses with genomic DNA from *P. patens* and the delta6-desaturase clone as probe where secondary cross-hybridizing bands were observed (data not shown).

- 40 The fact that the K2 isolate produced ARA upon addition of 18:3^{6,9,12}, excluded the possibility that the loss of delta6-desaturase activity in the knockouts lines was due to regulatory alterations.
- 45 Example 4: Functional expression of the delta6-desaturase cDNA of *P. patens* in Yeast

6

Expression experiments were performed in yeast with PPDES6-cDNA in order to show that the observed reduction of delta₆-desaturase activity in the knock-out isolates of *P. patens* was indeed due to the disruption of the corresponding gene. The open reading frame 5 of the PPDES6-cDNA was subcloned in the yeast expression vector pYES 2 (Invitrogen) to generate the construct pYESdelta6. Transformed yeast cultures (strain INVSC1) cultures, with pYES2 and pYESdelta6, were grown on uracil-drop out medium with 2% raffinose and 1% Tergitol NP-40 (for the solubilization of fatty acids). For expression, cultures were grown to OD 600nm of 0.5 when galactose was added to a final concentration of 2%. In feeding experiments, fatty acids were solubilized in 5% tergitol and added to a final concentration of 0.0003%.

15 The results of the functional expression experiments are presented in Table 2. The production of fatty acids containing a double bond at carbon 6 is only possible in the presence of the expression construct carrying the delta₆-desaturase cDNA. Moreover, this enzyme has greater activity on substrates which already 20 contain double bonds at both the 9th and 12th carbons. Compare the conversion rates observed in the presence of the *P. patens* delta₆-desaturase of 18:1⁹ into 18:2^{6,9} and that of 18:2^{9,12} and 18:3^{9,12,15} into 18:3^{6,9,12} and 18:4^{6,9,12,15}, respectively.

25

Total fatty acids (%)				
	pYES2		pYESdelta6	
Fatty acid	-	-	+ 18:2 ^{9,12}	+ 18:3 ^{9,12,15}
16:0	16.4	16.1	23.8	25.8
16:1 ⁹	54.0	55.5	38.1	31.4
16:2 ^{6,9}	-	4.2	1.7	-
18:0	3.2	2.4	4.0	4.7
18:1 ⁹	24.9	19.7	19.1	19.2
18:2 ^{6,9}	-	0.6	0.2	-
18:2 ^{9,12}	-	-	8.5	-
18:3 ^{6,9,12}	-	-	4.0	-
18:3 ^{9,12,15}	-	-	-	11.7
18:4 ^{6,9,12,15}	-	-	-	3.0

Table 2: Expression of the delta₆-desaturase of *P. patens* in yeast. The fatty acid methyl esters of the total lipids from cells transformed with pYES2 (wild type control) and pYESdelta6 (delta₆-desaturase) were analyzed by GC. Particular fatty acids are expressed as % of total fatty acids.

Example 5: Generation of transgenic rape plants harboring the delta6-desaturase cDNA of *P. patens*

An expression binary construct carrying the *P. patens* delta6-desaturase (pJH9) was used to transform rape hypocotyls, var. Drakkar. Kanamycin resistant plants were regenerated (J. Scheffler and E. Heinz; unpublished results).

Vector construction: the construct PPDES6-cDNA was used as template in a PCR with the oligonucleotides: TG5:

CCGCTCGAGCGAGGTTGTTGGAGCGGC (position of the 5' end on the cDNA: 292) and TG3: CTGAAATAGTCTTGCTCC (position of the 5' end on the cDNA: 1001) as primers. The primer TG5 introduces an XhoI restriction site 32 bp upstream of the putative start codon. The XhoI-Eco47III fragment of PPDES6-cDNA was replaced by the same fragment from the PCR product. The resulting construct was named pZK.

The insert of pZK was moved into pRT99/35S as a XhoI/HindIII (blunt) into the XhoI and SmaI sites of pRT99/35S to generate the construct pSK. This construct has upstream of PPDES6-cDNA a CaMV 35S promoter and downstream CaMV 35S terminator.

The PPDES6-cDNA fragment plus the 35S terminator were excised upon digestion of pSK with XhoI, followed by blunting, and PstI. This fragment was cloned into pJH3 cut with BamHI, followed by blunting, and PstI. The resulting construct, pJH7, carries the PPDES6-cDNA under control of the napin promoter [16] and the 35S terminator.

The insert of pJH7 was digested with Bsp120I and NotI and cloned into the binary vector pRE1 cut with Bsp120I to generate the construct pJH9. This construct was transformed into Agrobacterium strain C58 and then used to transform rape hypocotyls.

Transgenic plants are being analyzed for the effect of the PPDES6-cDNA expression in fatty acid metabolism.

40 References:

1. Girke T. et al. 1998. Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*, *The Plant Journal* 15:39-48.

8

2. Napier J. et al. 1998. Identification of a *Caenorhabditis elegans* Delta6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem Journal* 330:611-4.
- 5 3. Murata N et al. 1996. Biosynthesis of gamma-linolenic acid in *cyanobacterium Spirulina platensis*, pp 22-32-. In: Gamma-linolenic acid, metabolism and its roles in nutrition and medicine. Huang, Y. and Milles, D.E. (eds.). AOC Press, Campaign, Illinois.
- 10 4. Sayanova, O. et al. 1997. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *PNAS* 94:4211-6.
- 15 5. WO 98/46764
6. Cho, H.P. et al. 1999. Cloning expression, and nutritional regulation of the mammalian delta-6 desaturase. *J. Biol. Chem* 274:471-7.
- 20 7. Aki T. et al. 1999. Molecular cloning and functional characterization of rat delta-6 fatty acid desaturase. *Biochem. Biophys. res. Commun.* 255: 575-9.
- 25 8. Reddy, A.S. et al. 1993. Isolation of a (cap) delta6-desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 7120. *Plant Molecular Biology* 27: 293-300.
- 30 9. Reski R. et al. 1994. Genome analysis of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) BSG. *Mol. Gen. Genetics* 244: 352-9.
10. Sambrook J. et al. 1989. Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Laboratory Press.
- 35 11. Siebertz H.P. et al. 1979. Characterization of lipids from chloroplast envelopes. *Eur. J. Biochem.* 101: 429-38.
12. Anderson, B.A and Holman, R.T. 1974. Pyrrolidides for mass 40 spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids* 9: 185-90.
13. Schäfer D. et al. 1991. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Mol. Gen. Genetics* 226: 418-24.

45

9

14. Töpfer, R. et al. 1993. Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. Methods of Enzymol. 217: 66-78-
- 5 15. Töpfer, R. et al. 1987. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. Nucl. Acids Res. 15: 5890.
- 10 16. Scofield, S.R. and Crouch, M.L. 1987. Nucleotide sequence of a member of the napin storage protein family from Brassica napus. J. Biol. Chem. 262:12202-8.

Figure legends:

- 15 Fig 1: Nucleotide sequence and deduced amino acid sequences of the *Physcomitrella patens* delta6-desaturase cDNA clone
- Fig 2: Nucleotide sequence of the *Physcomitrella patens* delta6-desaturase genomic clone
- 20 20 Fig 3: Knock-out construct for the delta6-desaturase

25

30

35

40

45

Claims

1. Polypeptide having a delta₆ desaturase activity and having
5 the amino acid sequence described in Fig. 1, or a amino acid
sequence derived from Fig. 1 by insertion, deletion or sub-
stitution of up to 40 % of the amino acids.
2. Polynucleotide sequence coding for a polypeptide according to
10 claim 1.
3. Process for production of unsaturated fatty acids by incuba-
tion saturated fatty acids with a polynucleotide according to
15 claim 1 under conditions where this polypeptide has a delta₆
desaturase activity.
4. Process for production of unsaturated fatty acids in plants
by producing transgenic plants which have been transformed
20 with a polynucleotide according to claim 2, growing these
transformed plants and isolating the unsaturated fatty acids
from these plants.
5. Process according to claim 3 or 4 for the production of ara-
chidonic acid.
25

30

35

58/99 Dp/fe

40

45

6

Abb. 3.1.1.2 Nucleotidsequenz der *PPDES6*-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Das Start- und das Stop-Codon des ermittelten offenen Leserahmens sind unterkragt. Die unterstrichenen Bereiche markieren die Bindungsstellen der Primer DSF/SDS (DeG), die zur Isolation der cDNA 10 Minuten (vergl. Abb. 3.1.2.1), und die Primer C/D, die zur Amplifikation des zugehörigen genomischen Fragments *PPDES6* (Abb. 3.1.3.3) eingesetzt wurden. Die acht invarianten Aminosäuren der Cytochrom-b₅-Familie und die drei Histidboxen der Desaturase-Domäne sind grau schattiert. Eine unvollständiger cDNA-Klone, der im Überlappungsbereich mit der *PPDES6*-cDNA identisch war, enthielt das verlangerte 3'-Ende 5'-ATGAAGAGGCCAGTCGTCTCTGGTC-3'. das zur Ableitung von Primer 4 herangezogen wurde (vergl. Abb. 3.3.1).

	20	40	60	80	
C→	0				72
E1 (≥128 bp)	100	120	140	160	160
ACAAATGGTGGAAATGGTATCCATCGTCGAGAGCAGTTGAAGGGAGGATTGGAGTGGCTAGTCGCACTCGTCTGGCATTTGTG : 162	200	220	240	260	
I1 (222 bp)	280	300	320	340	360
TCTCTTATAATTGGTTTATTCGAGTGGCTGGTTGGTTCGGTGCAGCATGGTGTTCACAGGCAGTTATTATGGACACTGTT : 342	380	400	420	440	
CTTTTAGE	351				
E2 (203 bp)	460	480	500	520	540
M V F A G G G L Q Q	560	580	600	620	
ATGCTATGCATTATGCCCTCTAGATCCACTTGAGTGGAAATGTGAGACATCAGAAGAAACTTCGGTTTGTATAGC : 612	553				
CTCCCACCCCTTCGTCACCTGATCAGAATGCTTTGCTTTCTATCGGGAAATGTGAGACATCAGAAGAAACTTCGGTTTGTATAGC : 702	640	660	680	700	720
TTGAGTCTGATTCGATTGTTACACCCGTGTCGGCAATGCAATGGCTTATCAGAAGTCAAACCACTTCGATGTGCCCTTACCCCT : 792	740	760	780	800	
CCATGCTAACAACTCACCTGATTTGCAAGTTCTAGTTGCTCAGATCTGCTGATGTGAAACCCCTTATTGTAAGTGAACACTGTT : 882	820	840	860	880	900
I2 (603 bp)	920	940	960	980	
GGATGCAAACCTAACATGTAACCGTAACCGCGAGTAAGAATTTCGCTTCGCTTTGACAAGGTGTTCAATCTCATGGTATTAGCCTAG : 972	1000	1020	1040	1060	1080
GAGCTGGCTACTTACGTGTTCTAACCGGAAATTACGCASTATCTGCTTCGCTCAATGAGTAATGCGATCACGACCTTCACAGA : 1062	1100	1120	1140	1160	
TATTTGATTGATTGATTTCGATTACCTCTCGCTTGCCTGTCGAGGTTGCACCGTGTATTGAAATGCTGCGGATGTTCTAC : 1152	1180	1200	1220	1240	1260
TCAGC	1157				
G S W S V H S I Q P L K R L T S R K R V S E S A A V Q C I S	1280	1300	1320	1340	
E3 (347 bp)	1360	1380	1400	1420	1440
A E V Q R N S S T Q G T A E A L A E S V V K P T R R R S S Q	1460	1480	1500	1520	
W K K S T H P L S E V A V H N K P S O C W I V V K N K	1540	1560	1580	1600	1620
CTTAAAAGTAGTCTCCCCAAGGTTATACAGCTAATCATGATGATGAAACGGCGTGCATGTTGAGTAATCCGACTCTGTTATCCTG : 1602	1503				
I3 (186 bp)	1640	1660	1680	1700	
ATTTCGGATATTGCTACGCCCGTGCATCTGTTGGATGAGGGAAATTGCTGCCCTCAATTAAAGTTATGCTGATCACAGGAG : 1692	1720	1740	1760	1780	1690
Y D V S N F A D E H P G G S V I S T Y F G R D G T D V E S S	1800				
E4 (150 bp)	1900	1920	1940	1960	1980
F H A A S T W K I L G D F Y I G D V E	1820	1840	1860	1880	
CTTTTGGGATTTAGGATTGTTAATCTCAAGAATGGTCAGTCCTGCTAGATTCTGTTGACCAACTTGCTTTCCAATTTCAG : 1962	1939				
I4 (204 bp)	2000	2020	2040	2060	R V E
TAGATITAGTACACGGGTTAATAGTGAATGAGTAGTCAAGTTCAGGTTACCTTCCTGCTAGATTCTGTTGACCAACTTGCTTTCCAATTTCAG : 2052	2044				

Abb. 3.1.3.3 Nucleotidsequenz mit abgeleiteter Aminosäuresequenz von PPDES6. Das hier dargestellte genomische Fragment PPDES6 wurde mit den Primern C und D amplifiziert, die von der cDNA-PPDES6 abgeleitet waren. Die ermittelten Exons E1 - E7 sind grau, die Introns i1 - i6 weiß hinterlegt. Ihre Längen in bp sind am linken Rand angegeben. Die von den Exons 2 - 7 codierte Aminosäuresequenz PPDES6 ist über der Nucleotidsequenz dargestellt. Jeweils das erste und letzte Nucleotid der sieben Exons ist unterstrichen und darunter dessen Position angegeben. Die Primer-

2/2



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP0016223



10/019048

REC'D 11 SEP 2000

WIPO

PCT

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

100 30 976.3

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN

COMPLIANCE WITH

RULE 17.1(a) OR (b)

Anmeldetag:

30. Juni 2000

Anmelder/Inhaber:

BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung:

Δ6-Desaturasegene exprimierende Pflanzen und
PUFAS enthaltende Öle aus diesen Pflanzen und
ein Verfahren zur Herstellung ungesättigter
Fettsäuren

IPC:

C 12 N, A 01 H, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

Waasmaier



Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren, da-
5 durch gekennzeichnet, daß mindestens eine isolierte Nuklein-
säuresequenz, die für ein Polypeptid mit Δ6-Desaturase-
aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dar-
10 gestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des
degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1
ableiten
- 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure-
sequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dar-
gestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens
50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß
20 die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich
reduziert ist,

in einen Organismus eingebracht wird, dieser Organismus
angezogen wird, wobei der angezogene Organismus mindestens
25 1 Mol-% ungesättigte Fettsäuren bezogen auf den gesamten
Fettsäuregehalt im Organismus enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die
Nukleinsäuresequenz von einer Pflanze oder Alge stammt.
30
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,
daß die Nukleinsäuresequenz von Physcomitrella patens stammt.
- 35 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekenn-
zeichnet, daß es sich bei dem Organismus um ein Organismus
ausgewählt aus der Gruppe Bakterium, Pilz, Ciliat, Alge,
Cyanobakterium, Tier oder Pflanze handelt.
- 40 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekenn-
zeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze
oder Alge handelt.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Ölfruchtpflanzen handelt.
- 5 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der angezogene Organismus mindestens 5 Gew-% ungesättigte Fettsäuren bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt im Organismus enthält.
- 10 8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die ungesättigten Fettsäuren aus dem Organismus isoliert werden.
9. Transgener Organismus ausgewählt aus der Gruppe Pflanzen, Pilze, Ciliaten, Algen, Bakterien, Cyanobakterien oder Tiere, die mindestens eine isolierte Nukleinsäuresequenz enthalten, die für ein Polypeptid mit Δ6-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
 - 20 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 ableiten
 - c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
- 30 10. Transgener Organismus nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Organismus um eine Pflanze oder Alge handelt.
- 35 11. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8.
- 40 12. Verwendung der Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung nach Anspruch 11 oder transgene Organismen nach Anspruch 9 in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

Δ6-Desaturasegene exprimierende Pflanzen und PUFAS enthaltende Öle aus diesen Pflanzen und ein Verfahren zur Herstellung ungesättigter Fettsäuren

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren 10 zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismus bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ6-Doppelbindungen aufgrund 15 der Expression einer Δ-6-Desaturase aus Moos.

Außerdem betrifft die Erfindung transgene Organismen, die ein Δ6-Desaturasegen enthalten, sowie die Verwendung der im Verfahren hergestellten ungesättigten Fettsäuren bzw. Triglyceride mit 20 einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren.

Fettsäuren und Triglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem ob es sich um freie gesättigte oder 25 ungesättigte Fettsäuren oder um Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet, so werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren Babynahrung zur Erhöhung des Nährwertes zugesetzt. Hauptsächlich werden die ver- 30 schiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Sonnenblume und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vor- 35 teilhaft durch Verseifung hergestellt.

Je nach Anwendungszweck sind Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt, so sind z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättig- 40 ten Fettsäuren bevorzugt, da sie einen positiven Einfluß auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Möglichkeit einer Herzerkrankung haben. Auch eine positive Wirkung auf die Carcino- genese wird den ungesättigten Fettsäuren zugeschrieben. Sie sind außerdem wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von 45 Verbindungen, die wichtige biologische Vorgänge innerhalb des

Organismus steuern. Sie finden deshalb in verschiedenen diätischen Lebensmitteln oder Medikamenten Anwendung.

Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine $\Delta 9$ -Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine $\Delta 15$ -Desaturase in WO 94/11516 wird eine $\Delta 12$ -Desaturase beansprucht. $\Delta 6$ -Desaturasen werden in Girke et al. (The Plant Journal, 15, 1998: 39-48), Napier et al. (Biochem. J., 330, 1998: 611-614), Murata et al. (Biosynthesis of γ -linolenic acid in cyanobacterium Spirulina patens, pp 22-32, In: γ -linolenic acid, metabolism and its roles in nutrition and medicine, Huang, Y. and Milles, D.E. [eds.], AOC Press, Champaign, Illinois), Sayanova et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1997: 4211-4216), WO 98/46764, Cho et al. (J. Biol. Chem., 274, 1999: 471-477), Aki et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 255, 1999: 575-579), und Reddy et al. (Plant Mol. Biol., 27, 1993: 293-300) beschrieben. Weitere Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. Weitere $\Delta 6$ -Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US5,614,393, WO 96/21022, WO00/21557 und WO 99/27111 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschiedenen Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und charakterisiert sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organismus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird. Die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen beschrieben wie in WO 98/46763 WO98/46764, WO98/46765. Dabei wird auch die Expression verschiedener Desaturasen wie in WO99/64616 oder WO98/46776 und Bildung polyungesättigter Fettsäuren beschrieben und beansprucht. Bezuglich der Effektivität der Expression von Desaturasen und ihren Einfluß auf die Bildung polyungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, daß durch Expression einer einzelnen Desaturase wie im vorgenannten Stand der Technik beschrieben lediglich geringe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren beispielsweise an $\Delta 6$ ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B. γ -Linolensäure erreicht wurden und werden.

Nach wie vor besteht daher ein großer Bedarf an neuen und besser geeigneten Genen, die für Enzyme codieren, die an der Biosynthese ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind und es ermöglichen, diese in einem technischen Maßstab herzustellen. Weiterhin besteht
5 nach wie vor ein Bedarf an verbesserten Verfahren zur Gewinnung möglichst hoher Gehalte an polyungesättigten Fettsäuren.

Es bestand daher die Aufgabe ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren unter Verwendung von Genen, die
10 beispielsweise für Desaturase-Enzyme codieren und die an der Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Samen einer Ölsaft beteiligt sind, bereitzustellen und so den Gehalt polyungesättigter Fettsäuren zu erhöhen. Diese Aufgabe wurde durch ein Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren
15 gelöst, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit Δ6-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
20
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 ableiten
- 25 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert
30 ist,

in einen Organismus eingebracht wird, dieser Organismus angezogen wird, wobei der angezogene Organismus mindestens 1 Mol-% ungesättigte Fettsäuren bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt
35 im Organismus enthält.

Unter Anzucht des Organismus ist die Kultivierung von Pflanzen ebenso zu verstehen wie die Anzucht von eukaryontischen oder prokaryontischen Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen, Pilzen,
40 Ciliaten, Algen, Cyanobakterien, tierischen oder pflanzlichen Zellen oder Zellverbänden oder die Anzucht von Tieren.

Die in den im erfundungsgemäßen Verfahren gewonnenen Organismen enthalten in der Regel ungesättigte Fettsäuren in Form von gebundenen Fettsäuren, das heißt die ungesättigten Fettsäuren liegen überwiegend in Form ihrer Mono-, Di- oder Triglyceride, Glycolipide, Lipoproteine oder Phospholipide wie Öle oder Lipide

- oder sonstig als Ester oder Amide gebundenen Fettsäuren vor. Auch freie Fettsäuren sind in den Organismen in Form der freien Fettsäuren oder in Form ihrer Salze enthalten. Die freien oder gebundenen ungesättigten Fettsäuren enthalten vorteilhaft gegen-
5 über den Ausgangsorganismen einen erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit Δ_6 -Doppelbindungen wie vorteilhaft γ -Linolensäure. Die durch Anzucht im erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen Organismen und die in ihnen enthaltenen ungesättigten Fettsäuren können direkt beispielsweise zur Herstellung von pharmazeutischen
10 Zubereitungen, von Agrochemikalien, Futtermitteln oder Lebensmitteln verwendet werden oder aber nach Isolierung aus den Organismen. Dabei können alle Stufen der Aufreinigung der ungesättigten Fettsäuren verwendet werden, das heißt von Rohextrakten der Fettsäuren bis zu vollständig gereinigten Fettsäuren sind für
15 die Herstellung der vorgenannten Produkte geeignet. In einer vorteilhaften Ausführungsform können die gebundenen Fettsäuren aus beispielsweise den Ölen bzw. Lipiden beispielsweise über eine basische Hydrolyse z.B. mit NaOH oder KOH freigesetzt werden. Diese freien Fettsäuren können direkt im erhaltenen Gemisch oder
20 nach weiterer Aufreinigung zur Herstellung von pharmazeutischen Zubereitungen, von Agrochemikalien, Futtermitteln oder Lebensmitteln verwendet werden. Auch können die gebundenen oder freien Fettsäuren zur Umesterung oder Veresterung beispielsweise mit anderen Mono-, Di- oder Triglyceriden oder Glycerin verwendet
25 25 werden, um den Anteil an ungesättigten Fettsäuren in diesen Verbindungen beispielsweise in den Triglyceriden zu erhöhen.

- Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, indem man Triglyceride mit gesättigten oder ungesättigten oder gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit mindestens einem der Protein, das durch die Sequenz SEQ ID NO: 2 codiert wird, inkubiert. Vorteilhaft wird das Verfahren in Gegenwart von Verbindungen durchgeführt, die Reduktionsäquivalente
30 35 aufnehmen oder abgeben können. Anschließend können die Fettsäuren aus den Triglyceriden freigesetzt werden.

- Die oben genannten Verfahren ermöglichen vorteilhaft die Synthese von Fettsäuren oder gebundenen Fettsäuren wie Triglyceriden mit
40 einem erhöhten Gehalt an Fettsäuren mit Δ_6 -Doppelbindungen.

Als Organismen für die genannten Verfahren seien beispielhaft Pflanzen wie Arabidopsis, Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Tee, Karotte, Paprika, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Triticale, Tabak, Tomate, Raps, Kaffee, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Erdnuß, Rizinus, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (Carthamus

- tinctorius), Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Wein- spezies, oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze Mortierella, Saprolegnia oder Pythium, Bakterien wie die Gattung Escherichia, Cyanobakterien, Algen oder Protozoen wie Dinoflagellaten wie 5 Cryptocodium genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Mikroorganismen wie Pilze wie Mortierella alpina, Pythium insidiosum oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Canola, Färbersaflor (Carthamus tinctorius), Rizinus, Calendula, 10 Lein, Borretsch, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume, besonders bevorzugt werden Soja, Raps oder Sonnenblume.

Die in den Verfahren verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. 15 gezüchtet. Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Ciliaten, pflanzliche oder tierische Zellen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, 20 Spurenelemente wie Eisen-, Mangan-, Magnesiumsalze und gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0°C und 100°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C unter je nach Organismus Sauerstoffbegasung oder in Abwesenheit von Sauerstoff angezogen. Dabei kann der pH der Nährflüssigkeit auf einen festen Wert gehalten 25 werden, das heißt der pH wird während der Anzucht reguliert oder der pH wird nicht reguliert und verändert sich während der Anzucht. Die Anzucht kann batch weise, semi batch weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nach gefüttert werden. Auch eine Anzucht auf festen Medien 30 ist möglich.

Pflanzen werden nach Transformation in der Regel zunächst regeneriert und anschließend wie üblich angezogen bzw. angebaut. 35 Dies kann im Gewächshaus oder im Freiland erfolgen.

Aus den Organismen werden nach Anzucht die Lipide in üblicherweise gewonnen. Hierzu können die Organismen nach Ernte zunächst aufgeschlossen werden oder direkt verwendet werden. Die Lipide 40 werden vorteilhaft mit geeigneten Lösungsmitteln wie apolare Lösungsmittel wie Hexan oder Ethanol, Isopropanol oder Gemischen wie Hexan/Isopropanol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol bei Temperaturen zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 20°C bis 50°C extrahiert. Die Biomasse wird in der Regel mit einem Überschuss an Lösungsmittel extrahiert beispielsweise einem Überschuss von Lösungsmittel zu Biomasse von 1:4. Das Lösungsmittel wird anschließend beispielsweise über eine Destillation entfernt.

Die Extraktion kann auch mit superkritischem CO₂ erfolgen. Nach Extraktion kann die restliche Biomasse beispielsweise über Filtration entfernt werden.

- 5 Das so gewonnene Rohöl kann anschließend weiter aufgereinigt werden, beispielsweise in dem Trübungen über das Versetzen mit polaren Lösungsmittel wie Aceton oder Chloroform und anschließender Filtration oder Zentrifugation entfernt werden. Auch eine weitere Reinigung über chromatographische Verfahren,
- 10 Destillation oder Kristallisation ist möglich.

Zur Gewinnung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden werden diese in üblicher Weise, wie oben beschrieben, verseift.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, die nach den oben genannten Verfahren hergestellt wurden, sowie deren Verwendung zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Tierfutter, Kosmetika oder Pharmazeutika. Hierzu
- 20 werden diese den Nahrungsmitteln, dem Tierfutter, den Kosmetika oder Pharmazeutika in üblichen Mengen zugesetzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wurden durch Expression einer Δ6-Desaturase aus Moos in Organismen wie Pilze, Bakterien, Tieren oder Pflanzen, bevorzugt Pilzen, Bakterien und Pflanzen, besonders bevorzugt in Pflanzen, ganz besonders bevorzugt in Ölfruchtpflanzen wie Raps, Canola, Lein, Soja, Sonnenblume, Borretsch, Rizinus, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Kokosnuss, Erdnuß oder Kakaobohne höhere Gehalte an ungesättigten Fettsäuren wie γ-Linolensäure erhalten. Auch die Expression in Feldfrüchten, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Alfalfa, oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee) ist vorteilhaft. Durch die Expression eines Gens, das für eine Δ-6-Desaturase aus Moos codiert, in den oben genannten Organismen

35 können Gehalte an ungesättigten Fettsäuren in den Organismen von mindestens 1 Mol-%, bevorzugt mindestens 3 Mol-%, besonders bevorzugt mindestens 4 Mol-%, ganz besonders bevorzugt mindestens 5 Mol-% erreicht werden.

- 40 Unter Derivate(n) sind beispielsweise funktionelle Homologe der von SEQ ID NO: 1 codierten Enzyme oder deren enzymatischer Aktivität, das heißt Enzyme, die dieselben enzymatischen Reaktionen wie die von SEQ ID NO: 1 katalysieren, zu verstehen. Diese Gene ermöglichen ebenfalls eine vorteilhafte Herstellung
- 45 von ungesättigten Fettsäuren mit Doppelbindungen in Δ6-Position. Unter ungesättigten Fettsäuren sind im folgenden doppelt oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren, die Doppelbindungen aufweisen,

zu verstehen. Die Doppelbindungen können konjugiert oder nicht konjugiert sein. Die in SEQ ID NO: 1 genannte Sequenz codiert für ein Enzym, das eine Δ6-Desaturase-Aktivität aufweist..

- 5 Das erfindungsgemäße Enzym Δ6-Desaturase führt vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden eine *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇, ein (siehe SEQ ID NO: 1). Das Enzym hat außerdem eine Δ6-Desaturase-Aktivität, die vorteilhaft in Fettsäurereste von Glycerolipiden ausschließlich eine *cis*-Doppelbindung in Position C₆-C₇ einführt. Diese Aktivität hat auch das Enzym mit der in SEQ ID NO: 1 genannten Sequenz, bei dem es sich um eine monofunktionelle Δ6-Desaturase handelt.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenz(en) (für die Anmeldung soll der singular den plural umfassen und umgekehrt) oder Fragmente davon können vorteilhaft zur Isolierung weiterer genomischer Sequenzen über Homologiescreening verwendet werden.

- 20 Die genannten Derivate lassen sich beispielsweise aus anderen Organismen eukaryontischen Organismen wie Pflanzen wie speziell Moosen, Dinoflagellaten oder Pilze isolieren.

Weiterhin sind unter Derivaten bzw. funktionellen Derivaten der 25 in SEQ ID NO: 1 genannten Sequenz beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 50 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, vorteilhaft mindestens 70 % Homologie, bevorzugt mindestens 80 % Homologie, besonders bevorzugt mindestens 85 % Homologie, ganz besonders bevorzugt 90 % Homologie aufweisen.

- 30 Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäurebereich berechnet. Es wurde das Programm PileUp, BESTFIT, GAP, TRANSLATE bzw. BACKTRANSLATE (= Bestandteil des Programmpaketes UWGCG, Wisconsin Package, Version 10.0-UNIX, January 1999, Genetics Computer Group, Inc., Deverux et al., Nucleic. Acid Res., 12, 35 1984: 387-395) verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153). Die von den genannten Nukleinsäuren abgeleitete Aminosäuresequenz ist Sequenz SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Unter Homologie ist Identität zu verstehen, das heißt die Aminosäuresequenzen sind zu mindestens 40 50 % identisch. Die erfindungsgemäßen Sequenzen sind auf Nukleinsäureebene mindestens 65 % homolog, bevorzugt mindestens 70 %, besonders bevorzugt 75 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 80 %.

- 45 Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei

die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine erhalten bleibt.

- Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von der in
- 5 SEQ ID NO: 1 beschriebenen DNA-Sequenz oder Teilen dieser Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten wie beispielsweise den oben genannt isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den genannten Sequenzen. Zur
- 10 Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide beispielsweise der konservierten Bereiche, die über Vergleiche mit anderen Desaturasegenen in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Vorteilhaft werden die Histidin-Box-Sequenzen verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der
- 15 erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden. Je nach der verwendeten Nukleinsäure: Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standard-
- 20 bedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca. 10°C niedriger als die von DNA:RNA-Hybridien gleicher Länge.

- Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nuklein-
- 25 säure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die
- 30 Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese
- 35 angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der
- 40 Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann
- 45 der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids

Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

5

Weiterhin sind unter Derivaten Homologe der Sequenz SEQ ID No: 1 beispielsweise eukaryontische Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen.

10

Außerdem sind unter Homologen der Sequenz SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Diese Varianten können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch

15 Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirk-

samere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.

20

Unter Derivaten sind auch vorteilhaft Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich -1 bis -2000 vor dem Startcodon so verändert wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird. Weiterhin sind unter

25 Derivaten auch Varianten zu verstehen, die am 3'-Ende verändert wurden.

Die Nukleinsäuresequenzen, die für eine Δ6-Desaturase codiert, können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder 30 eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Δ6-Desaturase-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Codons erzeugt, die von den entsprechenden Wirtsorganismen beispielsweise Pflanzen bevorzugt werden. Dies führt in der Regel zu einer optimalen Expression der heterologen Gene. Diese von Pflanzen bevorzugten Codons können aus Codons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Ein Beispiel für *Corynebacterium glutamicum* ist gegeben in: Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Die Durchführung solcher Experimente sind mit Hilfe von Standardmethoden durchführbar und sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt.

45 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für das Δ6-Desaturase-Gen codieren, sind solche Derivate der erfindungsgemäßen Sequenz, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten

Funktionen, das heißt die enzymatische Aktivität der Proteine besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den

- 5 Codon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispiels-

- 10 weise der Erhöhung des Gehaltes von $\Delta 6$ -Doppelbindungen in Fettsäuren, Ölen oder Lipiden in der Pflanze durch Überexpression des $\Delta 6$ -Desaturase-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine,

- 15 die $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität aufweisen oder durch in vitro-Selektion ermittelt werden. Mögliche Techniken zur in vitro-Evolution von DNA zur Veränderung bzw. Verbesserung der DNA-Sequenzen sind beschrieben bei Patten, P.A. et al., Current Opinion in Biotechnology 8, 724-733 (1997) oder bei Moore, J.C.

- 20 et al., Journal of Molecular Biology 272, 336-347 (1997). Besonders geeignet sind codierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Codon-Nutzung erhalten werden.

- Die spezifische Codon-Nutzung kann ein mit pflanzengenetischen 25 Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine codieren, wobei

- 30 Bestandteil des Fusionsproteins ein $\Delta 6$ -Desaturase-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf $\Delta 6$ -Desaturase-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. eine Signalsequenz für das ER, das das $\Delta 6$ -Desaturase-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

- 40 Vorteilhaft können die $\Delta 6$ -Desaturase-Gene im erfindungsgemäßen Verfahren mit weiteren Genen der Fettsäurebiosynthese kombiniert werden. Beispiele für derartige Gene sind die Acetyltransferasen, weitere Desaturasen oder Elongasen ungesättigter oder gesättigter Fettsäuren wie in WO 00/12720 beschrieben. Für die in-vivo und 45 speziell in-vitro Synthese ist die Kombination mit z.B. NADH-Cytochrom B5 Reduktasen vorteilhaft, die Reduktionsäquivalente aufnehmen oder abgeben können.

- Unter den im erfundungsgemäßen Verfahren verwendeten Proteine sind Proteine zu verstehen, die eine in der Sequenz SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eine daraus durch Substitution, Inversion, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältliche Sequenz enthalten, wobei die enzymatische Aktivität des in SEQ ID NO: 2 dargestellten Proteins erhalten bleibt bzw. nicht wesentlich reduziert wird. Unter nicht wesentlich reduziert sind alle Enzyme zu verstehen, die noch mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % der enzymatischen Aktivität des Ausgangsenzyms aufweisen. Dabei können beispielsweise bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Raumerfüllung, Basizität, Hydrophobizität etc.) ersetzt werden. Beispielsweise werden Argininreste gegen Lysinreste, Valinreste gegen Isoleucinreste oder Asparaginsäurereste gegen Glutaminsäurereste ausgetauscht. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren in ihrer Reihenfolge vertauscht, hinzugefügt oder entfernt werden, oder es können mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden.
- Unter Derivaten sind auch funktionelle Äquivalente zu verstehen, die insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für Δ6-Desaturase codierende Sequenz beinhalten, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen, das heißt das deren enzymatische Aktivität nicht wesentlich reduziert ist. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der Δ6-Desaturase Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen codierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.
- Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt (= nicht wesentlich reduziert) oder verstärkt ist (= Enzymaktivität ist stärker als die Aktivität des Ausgangsenzym, das heißt Aktivität ist höher als 100 %, bevorzugt höher als 110 %, besonders bevorzugt höher als 130 %).

Die im erfundungsgemäßen Verfahren verwendeten oben genannten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft zum Einbringen in einen Wirtsorganismus in eine Expressionskassette inseriert. Die Nukleinsäuresequenzen können jedoch auch direkt in den Wirtsorganismus eingebracht werden. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei vorteilhaft beispielsweise eine DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete codierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine $\Delta 6$ -Desaturase mit den oben beschriebenen Sequenzen codieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Fettsäuren, Ölen oder 5 Lipiden mit Doppelbindungen in $\Delta 6$ -Position verleihen. Diese Sequenzen können homologen oder heterologen Ursprungs sein.

Unter einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt oder -fragment) ist die in SEQ ID NO: 1 genannte Sequenz, die sich 10 als Ergebnis des genetischen Codes und/oder deren funktionellen oder nicht funktionellen Derivate zu verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhaftweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden und welche die Expression der codierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. 15 Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise 20 handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Struktur- 25 genen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen 30 Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit 35 Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhaftweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression 40 der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Das $\Delta 6$ -Desaturase-Gen kann in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Auch 45 eventuell mit exprimierte Gene, die vorteilhaft an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind, können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette vorhanden sein.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der 5 Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- 10 Als Promotoren in der Expressionskassette sind grundsätzlich alle Promotoren geeignet, die die Expression von Fremdgenen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen oder Pilzen steuern können. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder Promotoren, die beispielsweise aus einem Pflanzen-15 virus entstammen. Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-PR- oder im λ-PL-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien
- 20 Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFα, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren wie CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], RUBISCO SSU, OCS, B33,
- 25 nos (= Nopaline Synthase Promotor) oder im Ubiquitin-Promotor enthalten. Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen Δ6-Desaturase-Gens in den Organismen vorteilhaft in den Pflanzen zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann.
- 30 Derartige vorteilhafte Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der PRP1-Promotor [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366], ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2,397-404), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor
- 35 (WO 95/19443), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor. Weitere Pflanzenpromotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel, der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J.
- 40 8 (1989) 2445-245), der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Accession Nummer U87999) oder ein Nodien-spezifischen Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwandt werden. Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzliche Promotoren, die die Expression in
- 45 Geweben oder Pflanzenteilen/-organen sicherstellen, in denen die Fettsäurebiosynthese bzw. dessen Vorstufen stattfindet wie beispielsweise im Endosperm oder im sich entwickelnden Embryo. Ins-

besondere zu nennen sind vorteilhafte Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten wie beispielsweise der USP-Promotor oder Derivate davon, der LEB4-Promotor, der Phaseolin-Promotor oder der Napin-Promotor. Der erfindungsgemäß aufgeführte
5 und besonders vorteilhafte USP-Promotor oder dessen Derivate vermitteln in der Samenentwicklung eine sehr früh Genexpression (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67). Weitere vorteilhafte samenspezifische Promotoren, die für monokotyle und dikotyle Pflanzen verwendet werden können, sind die für Dikotyle
10 geeignete Promotoren wie ebenfalls beispielhaft ausgeführte Napingen-Promotor aus Raps (US5,608,152), der Oleosin-Promotor aus Arabidopsis (WO98/45461), der Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris (US5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO91/13980) oder der Leguminosen B4-Promotor (LeB4, Baeumlein
15 et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) oder für Monokotyle geeignete Promotoren wie die Promotoren die Promotoren des lpt2- oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230) oder die Promotoren des Gersten Hordein-Gens, des Reis Glutelin-Gens, des Reis Oryzin-Gens, des Reis Prolamin-Gens, des Weizen Gliadin-
20 Gens, des Weizen Glutelin-Gens, des Mais Zein-Gens, des Hafer Glutelin-Gens, des Sorghum Kasirin-Gens oder des Roggen Secalin-Gens, die in WO99/16890 beschrieben werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die
25 die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen und Lipiden bzw. deren Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine samenspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor des Napin-Gens aus Raps
30 (US 5,608,152), des USP-Promotor aus Vicia faba (USP=unbekanntes Samenprotein, Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67), des Oleosin-Gens aus Arabidopsis (WO98/45461), des Phaseolin-Promotors (US 5,504,200) oder der Promotor des Legumin B4-Gens (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 35 233-9). Weiterhin sind zu nennen Promotoren, wie der des lpt2 oder lpt1-Gens aus Gerste (WO95/15389 und WO95/23230), die in monokotylen Pflanzen samenspezifische Expression vermitteln.

In der Expressionskassette (= Genkonstrukt, Nukleinsäurekonstrukt) können wie oben beschrieben noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie das Δ6-Desaturase-Gen liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthesegene
40 vorteilhaft der Fettsäurebiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Beispielsweise seien die Gene für die Δ15-, Δ12-, Δ9-, Δ5-, Δ4-Desaturase, die verschiedenen Hydroxylasen,
45

die Acyl-ACP-Thioesterasen, β -Ketoacyl-Synthasen oder β -Ketoacyl-Reductasen genannt. Vorteilhaft werden die Desaturasegene im Nukleinsäurekonstrukt verwendet.

- 5 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für die erfindungsgemäße Expressionskassette und das erfindungsgemäße Verfahren, wie unten beschrieben, verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

10

Es können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung gelesen wird und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente

- 15 (= erfindungsgemäße Nukleinsäuren) miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Poly-

- 20 linker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, 25 häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zum Wirtsorganismus beispielsweise zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz, die für ein im er- 30 findungsgemäßen Verfahren verwendetes $\Delta 6$ -Desaturase-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

- 35 Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, -primer- 40 repair-, Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, -chewing-back- oder Auffüllen von Überhängen für -bluntends-, können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

45

Von Bedeutung für eine vorteilhafte hohe Expression kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis 5 vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

- 10 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus Agrobacterium tumefaciens, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 15 835 ff) oder entsprechende funktionelle Äquivalente.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten Δ6-Desaturase-DNA-Sequenz sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen 20 Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor 25 Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben werden.

- Die DNA Sequenz codierend für eine Δ6-Desaturase aus Physcomitrella patens beinhaltet alle Sequenzmerkmale, die notwendig sind, um eine dem Ort der Fettsäure-, Lipid- oder Ölbiosynthese korrekte Lokalisation zu erreichen. Daher sind keine weiteren Targetingsequenzen per se notwendig. Allerdings kann eine solche Lokalisation wünschenswert und vorteilhaft sein und daher künstlich verändert oder verstärkt werden, sodaß auch solche Fusionskonstrukte eine bevorzugte vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung sind.

- Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in 40 Plastiden gewährleisten. Unter bestimmten Umständen kann auch ein Targeting in andere Kompartimente (referiert: Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423) z.B. in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER), Peroxisomen, Lipidkörper oder durch ein Fehlen entsprechender 45 operativer Sequenzen ein Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, wünschenswert sein.

Vorteilhaft erweist sich die für Δ6-Desaturase-Gene codierenden Nukleinsäuresequenzen zusammen mit mindestens einem Reportergen in eine Expressionskassette kloniert, die in den Organismus über einen Vektor oder direkt in das Genom eingebracht wird. Dieses Reportergen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo-, Biolumineszenz- oder Resistenz-assay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispiele seien als Reportergene Antibiotika- oder Herbizid-resistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Zucker- oder Nukleotidstoffwechselgene oder Biosynthesegene wie das Ura3-Gen, das Ilv2-Gen, das Luciferasegen, das β-Galactosidasegen, das gfp-Gen, das 2-Desoxyglucose-6-phosphat-Phosphatasegen, das β-Glucuronidase-Gen, β-Lactamasegen, das Neomycinphosphotransferasegen, das Hygromycinphosphotransferasegen oder das BASTA (= Gluphosinatresistenz)-Gen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transkriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine unterschiedliche Produktivität zeigen.

20

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der codierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden codierenden Sequenz für die Δ6-Desaturase DNA Sequenz operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, codierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der codierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation in Plastiden. Aber auch Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (= ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten sind bei Bedarf einsetzbar sowie Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693-8711).

40

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den USP- oder Napin-Promotor), das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Die Expressionskassette wird zur Expression in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtsorganismus beispielsweise einem Mikroorganismus wie einem Pilz oder einer Pflanze vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, 5 einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirtsorganismus ermöglicht. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR-Serie wie z.B. pBR322, pUC-Serie wie pUC18 oder pUC19, M113mp-Serie, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, 10 pIN-III¹¹³-B1, λgt11 oder pBdCI, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in *Bacillus* pUB110, pC194 oder pBD214, in *Corynebacterium* pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, weitere vorteilhafte Pilzvektoren werden von Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a 15 review", Yeast 8: 423-488] und von van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi] sowie in More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., p. 396-428: Academic Press: San Diego] und in "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" 20 [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge] beschrieben. Vorteilhafte Hefevektoren sind beispielsweise 2μM, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23. Beispiele für Algen- oder Pflanzenpromotoren sind 25 pLGV23, pGHlac^t, pBIN19, pAK2004, pVKH oder pDH51 (siehe Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Die oben genannten Vektoren oder Derivate der vorstehend genannten Vektoren stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch 30 Cloning Vectors (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S.71-119 beschrieben. Vorteilhafte Vektoren sind sog. shuttle- 35 Vektoren oder binäre Vektoren, die in *E. coli* und *Agrobacterium* replizieren.

Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren wie beispielsweise Phagen, Viren 40 wie SV40, CMV, Baculovirus, Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden, bevorzugt ist eine chromosomal Replikation.

- In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann die erfindungsgemäße Expressionskassette auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Organismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des 5 Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus der Expressionskassette als Vektor oder den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bestehen.
- 10 In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz auch alleine in einen Organismus eingebracht werden.
- Sollen neben der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz weitere 15 Gene in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reportergen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reportergen in je einem Vektor oder mehrere Gene zusammen in verschiedenen Vektoren in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig 20 oder sukzessive eingebracht werden können.
- Der Vektor enthält vorteilhaft mindestens eine Kopie der Nuklein- säuresequenzen, die für eine $\Delta 6$ -Desaturase codieren, und/oder der Expressionskassette.
- 25 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Transformationsvektor pRT ((a) Toepfer et al., 1993, Methods Enzymol., 217: 66-78; (b) Toepfer et al. 1987, Nucl. Acids. Res. 15: 5890 ff.) eingebaut werden.
- 30 Alternativ kann ein rekombinanter Vektor (= Expressionsvektor) auch in-vitro transkribiert und translatiert werden, z.B. durch Nutzung des T7 Promotors und der T7 RNA Polymerase.
- 35 In Prokaryoten verwendete Expressionsvektoren nutzen häufig induzierbare Systeme mit und ohne Fusionsproteinen bzw Fusions- oligopeptiden, wobei diese Fusionen sowohl N-terminal als auch C-terminal oder anderen nutzbaren Domänen eines Proteins erfolgen können. Solche Fusionsvektoren dienen in der Regel dazu: i.) die 40 Expressionsrate der RNA zu erhöhen ii.) die erzielbare Protein- syntheserate zu erhöhen, iii.) die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, iv.) oder die Reinigung durch einen für die Affinitäts- chromatographie nutzbare Bindesequenz zu vereinfachen. Häufig werden auch proteolytische Spaltstellen über Fusionsproteine 45 eingeführt, was die Abspaltung eines Teils des Fusionsproteins auch der Reinigung ermöglicht. Solche Erkennungssequenzen für

Proteasen erkennen sind z.B. Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

Typische vorteilhafte Fusions- und Expressionsvektoren sind pGEX
5 [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988) Gene
67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) and pRIT5
(Pharmacia, Piscataway, NJ) welches Glutathion S-transferase
beinhaltet (GST), Maltose Bindepotein, oder Protein A.

10 Weitere Beispiele für E. coli Expressionsvektoren sind pTrc
[Amann et al., (1988) Gene 69:301-315] und pET Vektoren [Studier
et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185,
Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene,
Amsterdam, Niederlande].

15 Weitere vorteilhafte Vektoren zur Verwendung in Hefe sind
pYEPsec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFA
(Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz
et al., (1987) *Gene* 54:113-123), and pYES-Derivate (Invitrogen

20 Corporation, San Diego, CA). Vektoren für die Nutzung in fila-
mentösen Pilzen sind beschrieben in: van den Hondel, C.A.M.J.J. &
Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development
for filamentous fungi", in: Applied Molecular Genetics of Fungi,
J.F. Peberdy, et al., eds., p. 1-28, Cambridge University Press:
25 Cambridge.

Alternativ können auch vorteilhaft Insektenzellexpressionsvekto-
ren genutzt werden z.B. für die Expression in SF 9 Zellen. Dies
sind z.B. die Vektoren der pAc Serie (Smith et al. (1983) *Mol.*
30 *Cell Biol.* 3:2156-2165) und der pVL series (Lucklow and Summers
(1989) *Virology* 170:31-39).

Des weiteren können zur Genexpression vorteilhaft Pflanzen-
zellen oder Algenzellen genutzt werden. Beispiele für Pflanzen-
35 expressionsvektoren finden sich in Becker, D., et al. (1992)
"New plant binary vectors with selectable markers located
proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197
oder in Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for
plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

40 Weiterhin können die für die Δ6-Desaturase codierenden Nuklein-
säuresequenzen in Säugerzellen exprimiert werden. Beispiele
für entsprechende Expressionsvektoren sind pCDM8 und pMT2PC
genannt in: Seed, B. (1987) *Nature* 329:840 oder Kaufman et al.
45 (1987) *EMBO J.* 6: 187-195). Dabei sind vorzugsweise zu nutzende
Promotoren viralen Ursprungs wie z.B. Promotoren des Polyoma,
Adenovirus 2, Cytomegalovirus oder Simian Virus 40. Weitere

prokaryotische und eukaryotische Expressionssysteme sind genannt in Kapitel 16 und 17 in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 5 1989.

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, der Expressionskassette oder des Vektors in Organismen beispielsweise in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann 10 bekannten Methoden erfolgen.

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von 15 F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, von D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Habor Laboratory Press oder Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular 20 Biology*, *Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press entnehmen.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus 25 Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode -, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. 30 Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. 35 Wu, Academic Press (1993) 128-143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 40 12 (1984) 8711). Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet 45 und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen mit Agrobacterium tumefaciens wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res.

(1988) 16, 9877 beschrieben oder ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

5

Mit einem wie oben beschriebenen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen wie Testpflanzen wie Arabidopsis oder Kulturpflanzen wie Getreide, Mais, Hafer, Roggen, Gerste, Weizen,

10 Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Triticale, Reis, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Kaffee,

Kakao, Tee, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, insbesondere von Öl-haltigen Kulturpflanzen,

15 wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Borretsch, Lein, Sonnenblume, Canola, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterien-

lösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert 20 werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S.D. Kung und

25 R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Als Organismen bzw. Wirtsorganismen für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die verwendete Expressionskassette oder den verwendeten Vektor eignen sich prinzipiell

30 vorteilhaft alle Organismen, die in der Lage sind Fettsäuren speziell ungesättigte Fettsäuren zu synthetisieren bzw. für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kultur-

35 pflanzen wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Mikroorganismen wie Pilze beispielsweise die Gattung Mortierella, Saprolegnia oder Pythium, Bakterien wie die Gattung Escherichia, Cyanobakterien, Ciliaten, Thrausto- oder Schizichytrien, Algen oder Protozoen wie Dino-

40 flagellaten wie Cryptecodinium genannt. Bevorzugt werden Organismen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Pilze der Gattungen Mortierella oder Pythium wie Mortierella alpina, Pythium insidiosum oder Pflanzen wie Soja, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor, Rizinus,

45 Calendula, Erdnuß, Kakaobohne oder Sonnenblume, besonders bevorzugt werden Soja, Raps, Sonnenblume, Rizinus, Mortierella oder

Pythium. Prinzipiell sind als Wirtsorganismen auch transgene Tiere geeignet beispielsweise C. elegans.

Nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression des Δ6-Desaturase-Gens spezifisch in den Blättern, in den Samen, den Knollen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche Fett-säuren, Öle oder Lipide mit Δ6-Doppelbindungen überproduzierenden transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Gegenstand sind transgene Pflanzen beispielsweise Kulturpflanzen wie Mais, Hafer, Roggen, Weizen, Gerste, Mais, Reis, Soja, Zuckerrübe, Canola, Triticale, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Tabak, Tomate, Kaffee, Kakao, Tee, Karotte, Paprika, Raps, Tapioka, Maniok, Pfeilwurz, Tagetes, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, Kartoffel, insbesondere Öl-haltige Kulturpflanzen, wie Soja, Erdnuß, Rizinus, Borretsch, Lein, Sonnenblume, Canola, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuß, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne, Testpflanzen wie *Arabidopsis* oder sonstige Pflanzen wie Moose oder Algen enthaltend eine erfindungsgemäße funktionelle Nukleinsäuresequenz oder eine funktionelle Expressionskassette. Funktionell bedeutet hierbei, daß ein enzymatisch aktives Enzym gebildet wird.

Die Expressionskassette oder die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthaltend eine Δ6-Desaturasegensequenz kann darüber hinaus auch zur Transformation der oben beispielhaft genannten Organismen wie Bakterien, Cyanobakterien, filamentösen Pilzen, Ciliaten, Tiere oder Algen mit dem Ziel einer Erhöhung des Gehaltes an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden Δ6-Doppelbindungen eingesetzt werden. Bevorzugte transgene Organismen sind Bakterien, Cyanobakterien, filamentöse Pilze oder Algen.

Unter transgenen Organismen sind Organismen zu verstehen, die eine Fremde aus einem anderen Organismus stammende Nuklein-säure, die für eine im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Δ6-Desaturase codiert, enthalten. Unter transgenen Organismen sind auch Organismen zu verstehen, die eine Nukleinsäure, die

- aus demselben Organismus stammt und die für eine Δ6-Desaturase codiert, enthält, wobei diese Nukleinsäure als zusätzliche Genkopie enthalten ist oder nicht in der natürlichen Nukleinsäureumgebung des Δ6-Desaturase-Gens enthalten ist. Transgene
- 5 Organismen sind auch Organismen bei denen die natürliche 3'- und/oder 5'-Region des Δ6-Desaturase-Gens durch gezielte gentechnologische Veränderungen gegenüber dem Ausgangsorganismus verändert wurde. Bevorzugt sind transgene Organismen bei denen eine Fremd-DNA eingebracht wurde. Besonders bevorzugt sind trans-
- 10 gene Pflanzen, in die Fremd-DNA eingebracht wurde. Unter transgenen Pflanzen sind einzelne Pflanzenzellen und deren Kulturen wie beispielsweise Kalluskulturen auf Festmedien oder in Flüssigkultur, Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu verstehen.
- 15 Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind transgene Organismen ausgewählt aus der Gruppe Pflanzen, Pilze, Ciliaten, Algen, Bakterien, Cyanobakterien oder Tiere, bevorzugt transgene Pflanzen oder Algen, die mindestens eine isolierte Nukleinsäuresequenz enthalten, die für ein Polypeptid mit Δ6-Desaturase-
- 20 aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,
- 25 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 ableiten
- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 50 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert ist.
- 30 35 Erhöhung des Gehaltes von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ6-Doppelbindungen bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des Δ6-Desaturase-Gens in den erfindungsgemäßen Organismen vorteilhaft in den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen gegenüber den nicht gentechnisch modifizierten Ausgangspflanzen zumindest für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.
- Der Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden beispielsweise ist im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so daß eine samenspezifische Expression des Δ6-Desaturase-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Biosynthese

von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen -gewebe spezifisch erfolgen kann.

5

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen Δ6-Desaturase-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- 10 Die Wirksamkeit der Expression des Δ6-Desaturase-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Δ6-Desaturase-Gens und deren Auswirkung auf die Fettsäure-, Öl- oder Lipidbiosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshaus-
15 versuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind wie oben beschrieben transgene Pflanzen, transformiert mit einer Nukleinsäuresequenz, die für eine Δ6-Desaturase codiert, einem Vektor oder einer Expressions-

- 20 kassette enthaltend eine Δ6-Desaturase-Gensequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen wie oben beschrieben.
25 Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 30 - Verwendung einer Δ6-Desaturase-DNA-Gensequenz mit der in SEQ ID NO:1 genannten Sequenz oder mit dieser hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pilzen, Bakterien, Tieren oder Pflanzen bevorzugt Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ6-Doppelbindungen durch
35 Expression dieser Δ6-Desaturase DNA-Sequenz in Pflanzen.
- Verwendung der Proteine mit den Sequenzen SEQ ID NO: 2 zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren in Pflanzen, Pilzen, Bakterien oder Tieren bevorzugt Pflanzen.

40

45

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiele

5 Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren und Anzuchtsverfahren:

- Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer 10 von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Escherichia coli Zellen, Anzucht von Organismen und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.
- 15 Das Protonema von Physcomitrella patens (= P. patens) wurde in Flüssigmedium, wie von Reski et al. (Mol. Gen. Genet., 244, 1994: 352-359) beschrieben, angezogen.

Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 20 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenziator der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 3: Lipidanalyse aus dem Protonema von P. patens und aus Hefezellen

- 30 Die Lipide wurden mit Chloroform/Methanol wie bei Siebertz et al. (Eur. J. Biochem., 101, 1979: 429-438) beschrieben aus dem Protonema von S. patens oder aus Hefezellen extrahiert und über Dünnschichtchromatographie (= TLC) mit Diethylether ge-35 reinigt. Die erhaltenen Fettsäuren wurden zu den entsprechenden Methylestern transmethyliert und mit Gaschromatographie (= GC) analysiert. Die verschiedenen Methylester wurden mit den entsprechenden Standards identifiziert. Entsprechende Fettsäure-pyrrolididen wurden, wie bei Anderson et al. (Lipids, 9, 1974: 40 185-190) beschrieben, erhalten und mit GC-MS bestimmt.

Beispiel 4: Funktionelle Expression der $\Delta 6$ -Desaturase cDNA von *P. patens* in Hefen

Die Expression-Experimente in Hefen wurden mit PPDES6-cDNA durchgeführt. Knock-out-Experimente hatten gezeigt (Daten und Versuchsdurchführung nicht gezeigt bzw. beschrieben), daß der Knock-out zu einem Verlust an 20:3^{11,14,17-}, 20:4^{5,8,11,14-}, 20:4^{5,11,14,17-} und 20:5^{8,11,14,17-}-Fettsäuren führt. Gleichzeitig steigen die 18:2^{9,12-} und 18:3^{9,12,15-}-Fettsäuren an. Für die Expression in Hefe wurde 10 der PPDES6-cDNA in den Hefe-Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen) subkloniert. Der erhaltene Vektor erhielt die Bezeichnung pYES-delta6. Mit pYES2 (Kontrolle) und pYESdelta6 ($\Delta 6$ -Desaturase-cDNA) transformierte Hefekulturen wurden auf Uracil-dop-out Medium mit 15 2 % Raffinose und 1 % Tergitol NP-40 (zur Stabilisierung der Fettsäuren) angezogen. Für die Expression wurden die Zellen mit Galactose (Endkonzentration 2 %) bis zu einer optischen Dichte (= OD) von 0,5 bei 600nm angezogen. In Fütterungsexperimenten wurden Fettsäuren in 5 % Tergitol solubilisiert und mit einer Endkonzentration von 0,0003 % zugesetzt. Die Ergebnisse der 20 Expression sind Tabelle I zu entnehmen. Die Synthese von Fettsäuren mit einer Doppelbindung an Position 6 ist nur in Gegenwart des Expressionskonstrukts mit der $\Delta 6$ -Desaturase-cDNA möglich. Dieses $\Delta 6$ -Desaturase-Enzym hat eine größere Aktivität gegenüber Fettsäuren, die schon eine Doppelbindung an Position 9 oder 12 25 (Bezug auf Kohlenstoffatom in der Kette) enthalten. Es wurden die Fettsäuremethylester des gesamten Lipids der Hefen mit GC analysiert. Die einzelnen synthetisierten Fettsäuren werden in der Tabelle in Mol-% der gesamten Fettsäuren angegeben.

30 Tabelle I: Fettsäurezusammensetzung in transformierten Hefen gegenüber der Kontrolle

Gesamt Fettsäure (%)				
	pYES2		pYESdelta6	
35 Fettsäuren	-	-	+ 18:2 ^{9,12}	+18:3 ^{9,12,15}
16:0	16,4	16,1	23,8	25,8
16:1 ⁹	54,0	55,5	38,1	31,4
16:2 ^{6,9}	-	4,2	1,7	-
40 18:0	3,2	2,4	4,0	-
18:1 ⁹	24,9	19,7	19,1	19,2
18:2 ^{6,9}	-	0,6	0,2	-
18:2 ^{9,12}	-	-	8,5	-
45 18:3 ^{6,9,12}	-	-	4,0	-
18:3 ^{9,12,15}	-	-	-	11,7
18:4 ^{6,9,12,15}	-	-	-	3,0

Beispiel 5: Transformation von P. patens

Die Polyethylenglycol vermittelte direkte DNA-Transformation von Protoplasten wurde, wie von Schäfer et al. (Mol. Gen. Genet., 226, 1991: 418-424) beschrieben, durchgeführt. Die Selektion der Transformanten erfolgte auf G418-enthaltenden Medium (Girke et al., The Plant Journal, 15, 1998: 39-48).

Beispiel 6: Isolierung von Δ6-Desaturase cDNA und genomischen Clonen von P. patens

Mit Hilfe eines PCR-Ansatzes mit den folgenden degenerierten Oligonukleotiden als Primer:

- 15 A: TGGTGGAA(A/G)TGGA(C/A)ICA(T/C)AA und
B: GG(A/G)AA(A/C/G/T)A(A/G)(G/A)TG(G/A)TG(C/T)TC]

und dem folgenden Temperaturprogramm:

94°C, 3 min; [94°C, 20 sec; 45°C, 30 sec; 72°C, 1 min], 30 Zyklen;

20 72°C, 5 min, wurden schließlich Fragmente einer Δ6-Desaturase-Gen kloniert. Für die Klonierung wurde poly(A)RNA aus 12 Tage alten P. patens Protonema-Kultur isoliert. Mit dieser poly(A)RNA wurde die oben beschriebene PCR durchgeführt. Fragmente der erwarteten Fragmentlänge (500 bis 600 bp) wurden in pUC18 kloniert und
25 sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz eines PCR-Fragments zeigte Ähnlichkeiten zu bekannten Δ6-Desaturasen. Da bekannt war, daß P. patens eine Δ6-Desaturase besitzt, wurde angenommen, daß dieser Klon für einen Teil einer Δ6-Desaturase codiert.

30 Ein vollständiger cDNA-Klon (= PPDES6-cDNA) wurde aus einer P. patens cDNA-Bank von 12 Tage alten Protonemata mit Hilfe des oben genannten PCR-Fragments isoliert. Die Nukleotidsequenz wird in SEQ ID NO:1 wiedergegeben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO:2 zu entnehmen. Die zugehörige genomische Sequenz
35 (= PPDES6-Gen) konnte mit Hilfe der PCR und den folgenden Oligonukleotiden als Primer isoliert werden:

- C: CCGAGTCGCGGATCAGCC
D: CAGTACATTCTGGTCATTCACC:

40

Tabelle II gibt die Ergebnisse des Vergleichs zwischen der neuen P. patens Δ6-Desaturase über die gesamte Nukleinsäuresequenz mit folgenden bekannten Δ6-Desaturase wieder: *Borago officinalis* (U79010), *Synechocystis* sp (L11421), *Spirulina platensis* (X87094), *Caenorhabditis elegans* (AF031477), *Mortierella alpina* (WO 98/46764), *Homo sapiens* (Cho et al., J. Biol. Chem., 274, 1999: 471-477), *Rattus norvegicus* (AB021980) und *Mus musculus*

(Cho et al., J. Biol. Chem., 274, 1999: 471-477). Die Analyse wurde mit dem Gap Programm (GCG-Package, Version 9,1) und den folgenden Analysenparametern durchgeführt: scoring matrix, blosum62, gap creation penalty, 12; gap extension penalty, 4.

5 Die Ergebnisse geben die bestimmte Identität oder Ähnlichkeit [] in Prozent (%) im Vergleich zur P. patens-Sequenz wieder.

Tabelle II: Sequenzvergleich zwischen P. patens $\Delta 6$ -Desaturase und anderen $\Delta 6$ -Desaturasen

10

	Sequenz	Aminosäuresequenz-Identität [Ähnlichkeit] (%)
	Borago officinalis	31 [38]
15	Synechocystis sp.	21 [29]
	Spirulina platensis	20 [29]
	Caenorhabditis elegans	35 [43]
	Mortierella alpina	39 [47]
20	Homo sapiens	27 [38]
	Rattus norvegicus	28 [39]
	Mus musculus	29 [39]

Beispiel 7: Klonierung der $\Delta 6$ -Desaturase aus Physcomitrella patens

Die genomische $\Delta 6$ -Acyl lipid-Desaturase aus Physcomitrella patens wurde auf Grundlage der veröffentlichten Sequenz (Girke et al., Plant J., 15, 1998: 39-48) mittels Polymerasekettenreaktion und 30 Klonierung modifiziert, isoliert und für das erfundungsgemäße Verfahren eingesetzt. Dazu wurde zunächst mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von zwei genspezifischen Primern ein Desaturase-Fragment isoliert und in das bei Girke et al. (siehe oben) beschriebene Desaturasegen eingesetzt.

35

Primer TG5: 5'-ccgctcgagcgagggttgtggagcggc und
Primer TG3: 5'-ctgaaatagtcttgctcc-3'

dienten zunächst zur Amplifizierung eines Genfragmentes mittels 40 Polymerasekettenreaktion (30 Zyklen, 30 sek. 94°C, 30 sek. 50°C, 60 sek. 72°C, 10 min Nachinkubation bei 72°C, in einem Perkin Elmer Thermocycler).

- a) Klonierung eines Expressionsplasmids, das die $\Delta 6$ -Desaturase unter Kontrolle des 35S CaMV Promotors exprimiert:

5 Durch Primer TG5 wurde eine XhoI Schnittstelle in das Fragment eingeführt. Ein XhoI/Eco47III Fragment wurde durch Restriktion erhalten und in die bei Girke et al. beschriebene PPDES6-Gensequenz nach analoger Restriktion mit XhoI/Eco47III ausgetauscht. Das Konstrukt erhielt den Namen pZK. Das Insert von pZK wurde als XhoI/HindIII Fragment nach Auffüllen der HindIII-Schnittstelle mit Nukleotiden durch Behandlung mit dem Klenow Fragment der DNA Polymerase I in die XhoI/SmaI Schnittstellen von pRT99/35S kloniert. Das resultierende Plasmid pSK enthält den 35S-Promotor [Cauliflower-Mosaik-Virus, Franck et al. (1980) Cell 21, 285], die $\Delta 6$ -Desaturase aus Moos und den 35S-Terminator im Vektor pRT.

- 10 15 b) Konstruktion eines Expressionskonstruktes unter Kontrolle des Napin-Promotors:

20 Durch Schneiden des Plasmides pSK mit XhoI, Behandlung mit T4-DNA Polymerase und PstI-Restriktion wurde das erhaltene Promotor-Desaturase-Fragment mit Terminator in den Vektor pJH3 kloniert. Dazu wurde der Vektor BamHI geschnitten und mit Klenow-Enzym die Überhänge aufgefüllt sowie anschließend mit PstI nachgeschnitten. Es entstand durch Ligation des Desaturase-Terminator-Fragmentes in den Vektor das Plasmid pJH7, das einen Napin-Promotor beinhaltet (Scofield et al., 1987, J. Biol. Chem. 262, 12202-8). Die Expressionskassette aus pJH7 wurde mit Bsp120I und NotI geschnitten und in den binären Vektor pRE kloniert. Es entstand das Plasmid pRE-Ppdes6.

30 35 40 In einer PCR Reaktion wurde die erfindungsgemäße $\Delta 6$ -Desaturase cDNA aus *P. patens* als Matrize verwendet. Mithilfe der nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurde eine BamHI-Restriktionsschnittstelle vor dem Startcodon und drei Adeninnukleotide als Konsensustranslationssequenz für Eukaryoten in die $\Delta 6$ -Desaturase cDNA eingeführt. Es wurde ein 1512 Basenpaarfragment der $\Delta 6$ -Desaturase amplifiziert und sequenziert.

Pp-d6Des1: 5' - CC GGTACC aaaatggattcgccggcggtg -3'
Pp-d6Des2: 3' - CC GGTACC ttaactggtagcatgct -3'

45 Die Reaktionsgemische enthielten ca. 1 ng/micro 1 Matrizen DNA, 0,5 μ M der Oligonukleotide und, 200 μ M Desoxy-Nukleotide (Pharmacia), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C,

1,5 mM MgCl₂) und 0,02 U/ μ l Pwo Polymerase (Boehringer Mannheim) und werden in einer PCR-Maschine der Firma Perkin Elmer mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

5	Anlagerungstemperatur:	50°C, 30 sec
	Denaturierungstemperatur:	95°C, 30 sec
	Elongationstemperatur:	72°C, 90 sec
	Anzahl der Zyklen:	30

- 10 c) Konstruktion eines Expressionskonstrukt unter Kontrolle des USP-Promotors:

Das erhaltene Fragment von ca. 1,5 kB Basenpaaren wurde in den mit EcoRV gespaltenen Vektor pBluescript SK- (Stratagene) ligiert und stand für weitere Klonierungen als BamHI Fragment zur Verfügung.

15 Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pBin-USP erzeugt, der das BamHI-Fragment der Δ 6-Desaturase enthält. pBin-USP ist ein
20 Derivat des Plasmides pBin19. pBinUSP entstand aus pBin19, indem in pBin19 [Bevan et al. (1980) Nucl. Acids Res. 12, 8711] ein USP-Promotor als EcoRI-BamHI-Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., (1984) EMBO J. 3, 835), wobei Nukleotide 11749-11939 als PvuII-HindIII-
25 Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors kloniert. Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert (Primersequenz: 5'-GTCGACCCGGCGACTAGTG-
30 GGCCCTCTAGACCCGGGGATCC GGATCTGCTGGCTATGAA-3'). Das PCR-
35 Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in den Vektor pBin19 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pBinUSP.

- 40 d) Konstruktion eines Expressionskonstrukt unter Kontrolle des vATPase-C1-Promotors aus Beta vulgaris:

45 Analog zum Expressionsplasmid mit dem USP-Promotor wurde ein Konstrukt unter Verwendung des v-ATPase-c1-Promotors erstellt. Der Promotor wurde als EcoRI/KpnI Fragment in das Plasmid pBin19 mit OCS Terminator kloniert und über BamHI das Δ 6-Desaturasegen aus P. patens zwischen Promotor und

Terminator inseriert. Der Promotor entspricht einem 1153 Basenpaarfragment aus beta-Vulgaris (Plant Mol Biol, 1999, 39:463-475).

- 5 Das Konstrukt wurde zur Transformation von Arabidopsis thaliana und Rapspflanzen eingesetzt.

Beispiel 8: Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

- 10 Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen wurden binäre Vektoren in Agrobacterium tumefaciens C58C1:pGV2260 oder Escherichia coli genutzt (Deblaere et al., 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nord-
15 deutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtkultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter
20 steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm²) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgte eine 3-tägige Inkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit weiter-
25 geführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 µM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten sich nach
30 drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium zugegeben.

- Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und
35 nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf Δ6-Desaturase-Expression mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an oder Doppelbindungen an der Δ6-Position wurden identifiziert. Es konnte in den stabil
40 transformierten transgenen Linien, die das Transgen funktionell exprimierten, ein erhöhter Gehalt von Doppelbindungen an der Δ6-Position im Vergleich zu untransformierten Kontrollpflanzen festgestellt werden.

Beispiel 8: Lipidextraktion aus Samen

Das Pflanzenmaterial wurde zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

5

Dann wurde es 10 min bei 100°C abgekocht und nach dem Abkühlen auf Eis sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäure-

10 methylester (FAME) wurden in Petrolether extrahiert. Die extra-
hierten FAME wurden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fett-

15 säuremethylester wurde durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung konnte durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten

(Christie, 1997, in: Advances in Lipid Methodology, 4. Auflage:

20 Christie, Oily Press, Dundee, 119-169, und 1998, Gaschromato-
graphie-Massenspektrometrie Verfahren, Lipide 33:343-353) mittels GC-MS weiter analysiert werden. Die GC-Analysen der Fettsäure-
methylester aus den transgenen Rapssamen, die samenspezifisch die
Δ6-Desaturase exprimierten sind in Tabelle III dargestellt. Die
25 transgenen Rapssamen weisen mindestens 4,95 % γ-Linolensäure im
Samen auf.

Tabelle III gibt die GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus reifen, transgenen Rapssamen, die Δ6-Desaturase samen-

30 spezifisch exprimieren, wieder. Die Fettsäurezusammensetzung ist in [mol %] der Gesamtfettsäuren angegeben. Es ist festzustellen,
daß einzelne Pflanzen der T2 Generation, die aus positiv trans-
formierten und geselbsteten Pflanzen erhalten wurden, bis zu ca.
4,95 % γ-Linolensäure enthalten.

35

40

45

34

Tabelle III: GC-Analysen der Fettsäuremethylester von Raps

	Bezeichnung	18:0	18:1	18:2	18:3(γ)	18:3(α)	18:4
5	R2-T2-11/1a	1,98	53,58	22,63	3,86	11,38	0
	R2-T2-11/1b	1,86	52,04	25,45	2,31	11,39	0
	R2-T2-11/1c	1,95	49,17	24,30	2,84	9,20	0
	R2-T2-11/3	1,82	49,83	24,54	3,88	10,12	0
10	R2-T2-11/4	1,72	48,02	24,66	4,95	9,52	0
	R2-T2-11/5a	1,73	51,98	25,27	4,27	9,61	0
	R2-T2-11/5b	2,02	56,19	25,08	0	9,33	0
	R2-T2-11/5c	2,01	46,95	27,38	0	10,37	0
	R2-T2-11/5d	1,83	49,49	24,15	4,40	8,65	0
	R2-T2-11/6	2,08	54,52	23,94	2,05	9,29	0
15	R2-T2-11/10	1,94	53,92	22,81	4,06	9,44	0
	R2-T2-WT	1,90	47,75	30,91	0	10,51	0

20

25

30

35

40

45

Δ6-Desaturasegene exprimierende Pflanzen und PUFAS enthaltende Öle aus diesen Pflanzen und ein Verfahren zur Herstellung ungesättigter Fettsäuren

5

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren sowie ein Verfahren zur 10 Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft die Herstellung eines transgenen Organismusses bevorzugt einer transgenen Pflanze oder eines transgenen Mikroorganismus mit erhöhtem Gehalt an Fettsäuren, Ölen oder Lipiden mit Δ6-Doppelbindungen aufgrund 15 der Expression einer Δ-6-Desaturase aus Moos.

Außerdem betrifft die Erfindung transgene Organismen, die ein Δ6-Desaturasegen enthalten, sowie die Verwendung der im Verfahren hergestellten ungesättigten Fettsäuren bzw. Triglyceride mit 20 einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren.

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 2012

<212> DNA

<213> Physcomitrella patens

<220>

<221> CDS

<222> (319)..(1896)

<400> 1

ccgagtcgcg gatcagccat cgcccgccccca gggccgcctg cattgtgtgg gacgggtttg 60

gaggaggagg cagatgcgcg ggcgttggtg gagtcgtcat ccgaggatct actgcggcaa 120

tacctccggg ttttggagcg ggcaaactct gttgcggctc ggaaggctat aggttcggca 180

ggagactgtt gattttatgt cgggggcatt gccattgtgg agagcggggg agactcagga 240

tctgtgagtg tgcgtgcagc gccccactg ccgcagagcg tctgtgtatg acgaggttgt 300

tgtggagcgg ctttgaa atg gta ttc gcg ggc ggt gga ctt cag cag ggc 351

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly

1

5

10

tct ctc gaa gaa aac atc gac gtc gag cac att gcc agt atg tct ctc 399

Ser Leu Glu Glu Asn Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu

15

20

25

ttc agc gac ttc ttc agt tat gtg tct tca act gtt ggt tcg tgg agc 447

Phe Ser Asp Phe Phe Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser

30

35

40

gta cac agt ata caa cct ttg aag cgc ctg acg agt aag aag cgt gtt 495

Val His Ser Ile Gln Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val

45

50

55

tcg gaa agc gct gcc gtg caa tgt ata tca gct gaa gtt cag aga aat 543

Ser Glu Ser Ala Ala Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn

60

65

70

75

tcg agt acc cag gga act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag 591

Ser Ser Thr Gln Gly Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys

80

85

90

ccc acg aga cga agg tca tct cag tgg aag aag tcg aca cac ccc cta 639

Pro Thr Arg Arg Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu

95

100

105

tca gaa gta gca gta cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta 687
Ser Glu Val Ala Val His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val
110 115 120

aaa aac aag gtg tat gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga 735
Lys Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly
125 130 135

gga tca gtt att agt act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc 783
Gly Ser Val Ile Ser Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe
140 145 150 155

tct agt ttt cat gca gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac 831
Ser Ser Phe His Ala Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr
160 165 170

ttt ggt gac gtg gag agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat 879
Ile Gly Asp Val Glu Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp
175 180 185

ttc cga gaa atg aga gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt 927
Phe Arg Glu Met Arg Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser
190 195 200

tcg aaa ttg tac tat gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt 975
Ser Lys Leu Tyr Tyr Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe
205 210 215

gct gcg agc att gca ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt 1023
Ala Ala Ser Ile Ala Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val
220 225 230 235

ttg gct tca gct tgt atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg 1071
Leu Ala Ser Ala Cys Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp
240 245 250

cta tcc cat gat ttt ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt 1119
Leu Ser His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu
255 260 265

aat gaa gtt gtc ggg tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt 1167
Asn Glu Val Val Gly Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser
270 275 280

aca ggg tgg tgg aag gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat 1215
Thr Gly Trp Trp Lys Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn
285 290 295

gaa tgc gat cag act tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc 1263
Glu Cys Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu

300

305

310

315

ccc ctc att gcc tgg agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag 1311
Pro Leu Ile Ala Trp Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys
320 325 330

aca ttc ttg cga atc ctccaa tac cag cat ctg ttc atg ggt ctg 1359
Thr Phe Leu Arg Ile Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu
335 340 345

tta ttt ttc gcc cgt ggt agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc 1407
Leu Phe Phe Ala Arg Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr
350 355 360

tct aca gca gtg ctc tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act 1455
Ser Thr Ala Val Leu Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr
365 370 375

gtt ctg ttt cac tac ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc 1503
Val Leu Phe His Tyr Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu
380 385 390 395

cct ggt tgg aag cca tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc 1551
Pro Gly Trp Lys Pro Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser
400 405 410

ggc atg ctg ctg ggc ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag 1599
Gly Met Leu Leu Gly Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu
415 420 425

gtt tat aat tcg tct aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca 1647
Val Tyr Asn Ser Ser Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr
430 435 440

gg gat atc aaa gga aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt 1695
Arg Asp Ile Lys Gly Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu
445 450 455

aac agg caa ata gag cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat 1743
Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn
460 465 470 475

tta aac aaa ata gca cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt 1791
Leu Asn Lys Ile Ala Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys His Gly
480 485 490

ctg gtg tac gaa gac gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg 1839
Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu
495 500 505

aaa gca ttg aag gaa gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc 1887

Lys Ala Leu Lys Glu Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr
510 515 520

acc agt taa cagtcttgg aaagcttggc aattgatctt tattctccac 1936
Thr Ser
525

ggcagttgct tgttgtttt ggggtgaatg accgaatgta ctggcatcca ttcttcgtta 1996
gccatcaatt ttgaac 2012

<210> 2
<211> 525
<212> PRT
<213> Physcomitrella patens

<400> 2
Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn
1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe
20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln
35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala
50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly
65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg
85 90 95

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val
100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr
115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser
130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala
145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu
165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg
180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr
195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala
210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys
225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe
245 250 255

Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly
260 265 270

Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys
275 280 285

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr
290 295 300

Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp
305 310 315 320

Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile
325 330 335

Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg
340 345 350

Cly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu
355 360 365

Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr
370 375 380

Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro
385 390 395 400

Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly
405 410 415

Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser
420 425 430

Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly
435 440 445

Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu
450 455 460

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala
465 470 475 480

Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp
485 490 495

Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu
500 505 510

Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser
515 520 525